

**Sur une méthode de purification
de l'euglobuline
du sérum hémolytique**

THÈSE

PRÉSENTÉE

à la FACULTE de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON

et soutenue publiquement le 5 Juillet 1939

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Robert NAUDIN

Interne des Hôpitaux de Dijon

Né le 12 Mai 1913, à LADOIX-SERRIGNY (Côte-d'Or)



LYON

BOSC Frères M. & L. RIOU

IMPRIMEURS-ÉDITEURS

42, Quai Gailleton, 42

1939

**Sur une méthode de purification
de l'euglobuline du sérum hémolytique**

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyen honoraire	M. L. HUGOUNENQ
Doyen	M. J. LEPINE.
Assesseur	M. A. MOREL.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. LANNOIS, HUGOUNENQ, PIC, CONDAMIN,
PAVIOT, NICOLAS, VILLARD,, NOVE-JOSSERAND, TIXIER, COLLET, GAYET. CLUZET

PROFESSEURS

Cliniques médicales	{	MM. FROMENT
Cliniques chirurgicales		SAVY.
Clinique obstétricale et Accouchements		PATEL.
Clinique ophtalmologique	{	BERARD.
Cliniques dermatologique et syphiligraphique		VORON.
Clinique neurologique et psychiatrique ..		BONNET.
Clinique médicale infantile	{	FAVRE.
Clinique gynécologique.....		LEPINE (J.).
Clinique Oto-rhino-laryngologie		MOURIQUAND
Clinique urologique.....	{	COTTE.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie		REBATTU.
Clinique et prophylaxie de la tuberculose		CIBERT.
Clinique des maladies infectieuses	{	TAVERNIER.
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie		COURMONT.
Chimie biologique et médicale		J. CHALIER
Chimie organique et Toxicologie	{	PONTHUS.
Matière médicale et Botanique		FLORENCE
Parasitologie et Histoire naturelle médicale		MOREL.
Anatomie	{	MANCEAU.
Histologie		GUIART.
Physiologie		LATARJET.
Pathologie interne	{	POLICARD.
Pathologie générale et thérapeutique		HERMANN.
Anatomie pathologique		CORDIER.
Chirurgie opératoire	{	CADE.
Médecine expérimentale et comparée et Bactériologie		J.-F. MARTIN.
Médecine légale		SANTY.
Hygiène	{	ARLOING (F.).
Pharmacie et Pharmacologie		Etienne MARTIN
Hydrologie thérapeutique et Climatologie		ROCHAIX.
		LEULIER.
		PIERY.

PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

Chargé d'un cours d'Anatomie médico-chirurgicale	MM.	THEVENOT (Léon)
Chargé d'un cours d'Embryologie		NOEL.

AGREGES

MM.	MM.	MM.	MM.
GABRIELLE	GUILLEMINET	DE ROUGEMONT	MORIN
DECHAUME	MORENAS	P. RAVAUULT	BERTRAND
BERNHEIM	REVOL	PIGEAUD	CLAVEL
POLLOSSON	ENSELME	CROIZAT	LEVRAT
CHAMBON	SEDALLIAN	DELORE	
EPARVIER	CREYSSEL	JOSSERAND	



EXAMINATEURS DE LA THESE

MM. ARLOING, président : MOREL, assesseur ;
DUFOURT et JOSSERAND.

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

A LA MEMOIRE DE MON PERE

Qui m'inspira ma vocation médicale et dont la vie de labeur et de sacrifice restera toujours pour moi un gage de fidélité au Devoir.

A LA MEMOIRE DE MA MERE

Que sa douceur et sa bonté inspirent mes actes, au cours de ma carrière.

A MA FEMME

Bien faible témoignage de mon affection.

A MA FILLE

MEIS ET AMICIS

En témoignage de reconnaissance à tous ceux qui m'ont témoigné quelque bienveillance au cours de mes études.

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR F. ARLOING

*Professeur de Médecine Expérimentale et de Bactériologie
à la Faculté de Médecine de Lyon*

Nous lui témoignons ici notre gratitude pour l'honneur qu'il nous a fait, en acceptant de présider cette thèse.

A NOS JUGES

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LECLERC

Directeur de l'Ecole de Médecine de Dijon

Professeur de Clinique Chirurgicale

Nous lui exprimons ici notre profonde reconnaissance pour l'intérêt qu'il nous témoigna lors de la maladie de notre père, pour l'accueil si bienveillant qu'il nous a toujours réservé dans son service et pour l'enseignement qu'il nous y a donné.

A MONSIEUR LE DOCTEUR PETITJEAN

Professeur de Clinique Médicale

Nous avons eu l'honneur et le plaisir d'être son interne.

Nous espérons avoir su profiter de son enseignement, qui a marqué d'une profonde « empreinte » notre formation médicale.

A MONSIEUR LE DOCTEUR CHARPENTIER

Directeur de l'Institut d'Hygiène

et Bactériologique de Dijon

Qui fut l'inspirateur de ce travail.
Nous le prions de trouver ici un faible témoignage des droits qu'il a acquis à notre reconnaissance.

A MONSIEUR LE DOCTEUR JEANNIN

Professeur de Clinique Infantile

En témoignage de notre profonde reconnaissance pour la bienveillance et le dévouement qu'il nous a toujours témoigné durant notre stage en son service.

A NOS MAÎTRES DES HÔPITAUX DE DIJON

Externat :

MONSIEUR LE PROFESSEUR LECLERC
MONSIEUR LE DOCTEUR BEL
MONSIEUR LE DOCTEUR MONTCHARMONT
MONSIEUR LE DOCTEUR JEANNIN

Conférence d'Internat :

MADemoisELLE LE DOCTEUR AUBERTIN
MONSIEUR LE DOCTEUR DUBARD
MONSIEUR LE DOCTEUR HUBNER

Internat :

MONSIEUR LE PROFESSEUR PETITJEAN
MONSIEUR LE DOCTEUR JEANNIN
MONSIEUR LE DOCTEUR MOREAU
MONSIEUR LE DOCTEUR LONGIN
MONSIEUR LE DOCTEUR BEL
MONSIEUR LE DOCTEUR ROUX

Sur une méthode de purification de l'euglobuline du sérum hémolytique

INTRODUCTION

La propriété antigène que possède une grande partie des substances colloïdales constitutives de la matière vivante, joue, en biologie, un rôle dont on ne saurait ignorer l'importance.

En effet, certains colloïdes, et plus particulièrement les protéines, injectées dans un organisme à doses croissantes et répétées, y provoquent la formation de substances qui leur sont spécifiquement antagonistes : les Anticorps.

Ces substances dont on ne connaît que les propriétés n'ayant jamais pu être isolées, se trouvent dans le sang et notamment dans le sérum sanguin.

Considérons, par exemple, le sérum sanguin d'un animal qui a reçu des injections répétées d'un antigène A.

Ce sérum réagit spécifiquement sur l'antigène A.

Cette réaction, que traduisent — suivant que l'antigène est une substance soluble (toxine) ou un corps microbien (culture microbienne) — les phénomènes de précipitation ou d'agglutination, est toujours décelée par la fixation de l'alexine.

Bordet a montré, en effet, que le complexe antigène-anticorps possède la propriété de s'emparer de l'alexine du sang.

L'anticorps joue, en thérapeutique, un rôle primordial. Il est capable, en effet, de neutraliser l'antigène « in vivo » lorsque celui-ci est pathogène.

Supposons qu'un de ces antigènes pénètre dans l'organisme, dans des conditions telles que se développe la maladie. L'injection à cet organisme, au moment opportun, d'une quantité suffisante d'un sérum possesseur de l'anticorps antagoniste, c'est-à-dire de l'immunsérum spécifique, inhibe l'action pathogène et rétablit ainsi l'état de santé. Ce principe est à la base même de la sérothérapie.

Les sérums thérapeutiques ou immunsérums proviennent tous du sang de cheval :

On immunise cet animal par des injections répétées d'un antigène agressif (toxine diphtérique ou tétanique, pneumocoque, venin de serpents, etc...) et lorsque la quantité d'anticorps ainsi formée est suffisante on prélève le sang, puis le sérum.

La thérapeutique possède ainsi une arme qui permet de porter directement dans l'organisme une substance spécifiquement curative. Cependant la pratique de la sérothérapie a mis en évidence certains accidents, liés à l'introduction de sérum dans l'organisme, et que l'on groupe sous le nom « d'accidents sériques ».

De modalités d'apparition très différentes, tantôt précoces — immédiatement ou quelques heures après l'injection — tantôt tardives — plusieurs jours après —

ils sont, dans la grande majorité des cas, bénins, et les quelques cas de mort, ayant fait l'objet de publication, ne peuvent en aucun cas contre-indiquer une méthode universellement adoptée aujourd'hui.

Il est très facile de provoquer expérimentalement de tels accidents chez l'animal.

Pratiquons, par exemple, sur un cobaye, une injection d'ovalbumine, puis trois semaines après renouvelons l'injection de cette substance :

A peine libéré de l'appareil de contention l'animal présente un aspect hébété, titube, se gratte le museau. Rapidement viennent les troubles respiratoires avec polypnée, puis dyspnée intense. A noter, alors, une agitation désordonnée, des mouvements convulsifs. Parfois émission d'urine et matières fécales. Enfin le cobaye se couche sur le flanc et tombe dans un coma progressif, se terminant par asphyxie en trois ou quatre minutes.

L'apparition du choc anaphylactique, presque toujours mortel pour le cobaye, est soumise à certaines lois, bien mises en évidence par Richet :

1° L'injection d'une substance albuminoïde dans un organisme le sensibilise à une deuxième injection de cette substance ;

2° Une période de une à trois semaines est nécessaire pour développer cet état de sensibilité spécifique ;

3° Les doses sensibilisantes sont extrêmement faibles.

D'autres accidents, cliniquement identiques d'ailleurs au choc anaphylactique, peuvent survenir au cours de la sérothérapie. Ils consistent dans le fait

que, parfois, l'injection d'une protéine étrangère dans un organisme neuf, c'est-à-dire n'ayant jamais reçu cette protéine (à l'inverse de l'anaphylaxie), peut déterminer des accidents anaphylactiques, occasionnés, semble-t-il, par une rupture d'équilibre colloïdal du sang. Lors d'une injection de sérum on introduit avec les anticorps, but même de la méthode, leur vecteur, c'est-à-dire les protéines de sérum de cheval. Un choc protéique est donc à redouter.

Dans ces conditions les biologistes ont cherché à diminuer les chances de choc, à réduire le pouvoir anaphylactisant du sérum.

Besredka a préconisé, avec succès, la méthode des injections subintrantes basées sur les constatations suivantes :

Chez un animal sensibilisé on évite les accidents de choc en introduisant dans l'organisme une dose minime d'antigène, avant l'injection déchaînante, cette dose jouant le rôle de « vaccin anti-anaphylactique ». Pratiquement on injecte une première fois 1/4 de cc., puis, une heure après : 1 cc., enfin, quatre heures après, la dose entière en une seule fois. Cette méthode, bien qu'utilisée couramment, avec succès, ne donne pas cependant une sécurité suffisante et ne permettrait pas notamment la sérothérapie intraveineuse sur une grande échelle.

On doit pouvoir résoudre ce problème en isolant l'immunsérum de toutes les protéines immunologiquement inertes pour ne conserver que les protéines actives, c'est-à-dire douées du pouvoir anticorps.

C'est de cette conception qu'est né le problème de

la purification des sérums thérapeutiques dont la solution adoptée en pratique consiste à extraire la pseudoglobuline.

On sait que l'anticorps se localise dans la globuline, au sein de laquelle il se répartit inégalement. Une petite fraction accompagne l'euglobuline et le reste suit le sort de la pseudoglobuline.

Pour purifier un immunsérum on précipite donc la globuline par le sulfate d'Ammonium (méthode d'Hofmeister), on dissout le précipité et on le soumet à la dialyse pour en retirer l'euglobuline qui précipite et entraîne évidemment un peu d'anticorps.

La solution de pseudoglobuline, après isotonisation, constitue le sérum purifié. Ce n'est pas une solution très satisfaisante du problème, mais c'est la meilleure que l'on possède actuellement.

Le sérum purifié contient, en effet, une partie importante des protéines sériques (40 à 50 % environ). Il possède de ce fait un pouvoir anaphylactisant notable, bien qu'inférieur à celui du sérum complet.

Peut-on envisager une meilleure solution ?

Il semble que non.

Certains auteurs admettent, en effet (devant l'impossibilité dans laquelle on se trouve, de séparer l'anticorps de la globuline) que l'immunisation doit modifier certains caractères de la globuline, en lui faisant acquérir la propriété anticorps.

C'est l'opinion que Veillez exposait il y a quelques années au Congrès de Chimie Biologique de Lyon. Cette conception semble tout à fait admissible, puisque

jusqu'ici aucune méthode physique ou chimique n'a permis de purifier la globuline.

Certains faits, que nous exposerons plus loin, nous ont montré que la propriété anticorps n'est pas l'apanage de toute la globuline, mais seulement d'une petite fraction de cette protéine.

Ces expériences n'ayant été effectuées que sur une seule catégorie d'anticorps : les hémolysines ne sont évidemment pas suffisantes pour conduire à une affirmation. Elles fournissent néanmoins une indication qui peut être intéressante.

Nous rapportons dans ce travail, en détail, les expériences que nous avons effectuées à l'Institut d'Hygiène et Bactériologie de Dijon, sur les sérums hémolytiques de cheval (anti-mouton) et de lapin (anti-humain).

Dans ces recherches nous n'avons pas tenté de mettre au point une méthode définitive. Notre but est plus modeste.

Nous avons voulu simplement démontrer qu'on peut extraire de la globuline une substance qui s'y trouve contenue en faible quantité et qui possède l'anticorps.

Nous avons limité cette démonstration à l'euglobuline, facilement et rapidement isolable du sérum sanguin.

Nous adressons nos remerciements à M. le Docteur Charpentier et à M. Doladilhe qui, nous ayant inspiré ce travail, nous ont permis de le mener à bien par leur bienveillance constante et les conseils dont ils nous ont entouré.

CHAPITRE PREMIER

L'EUGLOBULINE

En 1888, Hofmeister montre que le sulfate d'Ammonium utilisé comme agent précipitant, permet de scinder l'édifice protéosérique en deux fractions :

La Globuline, l'Albumine.

La première, qui seule nous intéresse ici, précipite en totalité lorsque la concentration de sels dans le sérum atteint la moitié de la saturation.

Quelques années plus tard, Marcus Emil distingue deux parties dans la globuline d'Hofmeister. Cette fraction protéique, en effet, perd partiellement sa stabilité à la dialyse.

Au précipité, Marcus Emil donne le nom d'Euglobuline.

Porges, Spiro et Fuld, adoptant la conception de Marcus Emil et reprenant les travaux d'Hofmeister, démontrent qu'on peut, en effet, extraire de la globuline un constituant qui précipite en présence du Sulfate d'Ammonium saturé. Les définitions de Marcus Emil, de Porges, Spiro, Fuld ont actuellement force de lois.

L'Euglobuline représente finalement la fraction de l'édifice protéosérique qui, pour certains auteurs, pré-

cipite à la dialyse, et qui, pour d'autres, est destabilisée par le sulfate d'Ammonium au tiers saturé.

Ces deux fractions protéiques sont-elles identiques ? Nous l'ignorons. Aucun travail, à notre connaissance, n'a réussi à l'établir.

Il est difficile, en effet, de les identifier l'une à l'autre. L'Euglobuline de Marcus Emil ne représente pas une fraction bien définie de l'édifice protéosérique. La quantité de protéine qui précipite à la dialyse varie, en effet, suivant les conditions d'expérimentation.

Mazille a montré, par exemple, que le chauffage préalable du sérum (15 minutes à 55°) diminue considérablement la quantité d'Euglobuline isolable par la méthode de Marcus Emil, alors que le vieillissement du sérum non chauffé l'accroît sensiblement. Suivant l'histoire antérieure du sérum, l'expérimentateur sépare donc plus ou moins d'Euglobuline. Comment reconnaître, dans ce cas, une individualité physique quelconque à cette protéine ?

L'action du sulfate d'Ammonium paraît plus constante. Nous n'avons pas adopté cet agent précipitant pour la raison primordiale que la présence du sel dans l'Euglobuline gêne considérablement la purification.

C'est pourquoi nous nous sommes adressé à la méthode de Mazille, qui permet de séparer une quantité constante d'Euglobuline, *quelle que soit l'histoire antérieure du sérum*.

Cet auteur a constaté, en effet, que la précipitation de l'Euglobuline, qui se produit au cours de la dialyse, ne traduit pas toute l'action déséquilibrante exer-

cée par la déminéralisation. Cette influence est plus complète. Elle a pour objet de sensibiliser la protéine à l'action précipitante des ions H.

Il suffit, en effet, d'acidifier légèrement le dialysat pour augmenter la précipitation.

Mazille montre en somme qu'en milieu déminéralisé une partie des protéines sériques devient précipitable par les ions H. Ce déséquilibre présente le phénomène de Zone vis-à-vis de la concentration en ions H du dialysat.

Il existe donc un pH optima pour lequel la précipitation du dialysat présente une valeur maxima.

L'importance du précipité est, comme le signale l'auteur, indépendante de l'histoire antérieure du sérum.

La protéine obtenue contient, au même titre que l'Euglobuline, une fraction de l'anticorps. Mazille propose de lui donner le nom d'Euglobuline.

C'est une Euglobuline, ainsi définie, que nous utiliserons dans nos expériences.

Nous donnons ci-après, en détail, la technique de sa séparation.

Préparation de l'Euglobuline

Nous utilisons toujours des sérums préalablement chauffés (25 minutes à 55°) peu après leur sortie de l'organisme.

Doladilhe a montré, en effet, que le chauffage sta-

bilise le constituant visqueux de l'Euglobuline et facilite beaucoup son extraction.

On soumet le sérum sanguin à la dialyse simple par le procédé suivant :

Le sérum contenu dans un cornet de parchemin plonge dans un flacon d'eau distillée, fréquemment renouvelée (deux à trois fois par jour).

On cesse l'opération dès que l'eau de dialyse, ne contenant plus d'ions Cl, ne précipite plus en présence d'azotate d'argent.

Ce résultat est atteint en général au bout de cinq à six jours. Si le sérum a été chauffé, peu après sa sortie de l'organisme, on n'observe dans le dialysat aucun précipité ou tout au plus un précipité infime, facilement isolable par filtration ou centrifugation.

On ajoute ensuite au dialysat, goutte à goutte, une solution d'H. Cl centinormale jusqu'à l'apparition du premier trouble puis on continue jusqu'à précipitation massive et instantanée. Enfin on sépare le précipité par centrifugation.

Cette manipulation suppose que l'expérimentateur a pu doser exactement la quantité de la solution acide qui provoque la précipitation optima.

Ce résultat est rarement atteint et la plupart du temps le surnageant sérique contient encore un peu de protéine précipitable par les ions H.

Pour isoler cette dernière fraction protéique on prélève deux prises d'essais sur le surnageant. On ajoute à chacune d'elle une solution d'H. Cl. N/1000 ou NH₃ N/1000 jusqu'à apparition d'un trouble dans l'une d'elle.

On détermine ainsi dans quel sens il faut varier le pH du surnageant pour précipiter le reste de la globuline. Il suffit, en effet, d'ajouter goutte à goutte à ce surnageant une solution alcaline ou acide millinormale pour l'amener à précipitation.

Il semblerait plus simple de rechercher dès le début le pH pour lequel la précipitation du dialysat est maxima, en déterminant sur des prises d'essais, la quantité exacte de solution acide à ajouter.

Nous n'avons pas adopté cette méthode qui nécessite de trop importantes quantités de sérum, et notre approvisionnement étant limité nous avons dû recourir à la méthode exposée plus haut, plus empirique certes, mais combien plus économique.

CHAPITRE II

LES CONSTITUANTS DE L'EUGLOBULINE

Aucun auteur n'est parvenu à scinder en ses constituants l'Euglobuline définie par Marcus Emil ou Porges, Spiro et Fuld.

Les essais les plus récents sont, certainement, ceux de Sandor qui, étudiant la répartition des lipides dans l'euglobuline, est parvenu à distinguer plusieurs fractions différentes par leur teneur en lipides, mais qualitativement identiques par leur composition.

Sont-elles différentes du point de vue biologique ?

L'auteur n'a pas tenté de le savoir. Cette question ne rentrait d'ailleurs pas dans le travail particulièrement important qu'il a effectué.

Les difficultés insurmontables rencontrées lorsque l'on veut essayer de déterminer si l'euglobuline est un complexe formé par l'association de deux ou plusieurs constituants, s'expliquent, à notre avis, par le fait que la protéine obtenue par la méthode d'Hofmeister est mêlée à des sels étrangers.

L'euglobuline de Marcus Emil, privée de sels, se prête parfois beaucoup mieux à une séparation. Nous verrons plus loin les raisons pour lesquelles la tech-

nique de Marcus Emil accroît considérablement les difficultés de la séparation.

Doladilhe a montré dernièrement que l'euglobuline obtenue par dialyse, puis acidification d'un sérum, *chauffé peu après sa sortie de l'organisme*, peut être facilement et rapidement décomposé en deux fractions :

La protéine Visqueuse et l'Homoglobuline.

Ces deux fractions sont des constituants au sens strict du terme.

Ils sont, en effet, différents non seulement par leurs propriétés physiques, mais aussi — fait important pour le biologiste — par leurs caractères immunologiques.

La protéine Visqueuse est un complexe colloïdal particulièrement instable.

Doladilhe a montré, en effet, que l'état physique de la protéine Visqueuse évolue dès sa sortie de l'organisme. Cette évolution résulte d'une agglomération granulaire qui amène, peu à peu, le colloïde à dénaturation.

Ce mûrissement de la protéine visqueuse peut être ralenti considérablement par un chauffage modéré (55° pendant quelques heures).

Par contre le vieillissement (stérile et à 0°) l'accélère. Ce fait explique l'évolution continue des propriétés physiques de l'euglobuline, l'un de ses constituants évoluant en permanence. L'homoglobuline est au contraire un colloïde parfaitement stable, dont l'état physique ne varie pas.

Sur le terrain biologique les différences sont encore plus accentuées.

Les propriétés immunologiques de l'euglobuline plus précisément ses propriétés anticorps et anaphylactisantes sont localisées électivement dans la protéine visqueuse. L'homoglobuline en est dépourvue.

Les travaux de MM. Charpentier, Doladilhe, Morel, Placidi et Mazille, qui ne sont pas limités à l'euglobuline, mais ont porté aussi sur la pseudo-globuline (dont la structure comme l'a montré Doladilhe est semblable à celle de l'euglobuline) montrent que dans tous les cas envisagés la protéine visqueuse possède à elle seule la propriété anticorps et anaphylactisante.

La séparation de l'euglobuline en ses deux constituants s'effectue d'une façon très simple, par centrifugation à grande vitesse et de longue durée (4.000 tours pendant dix minutes ou 6.000 tours pendant cinq minutes). Cette manœuvre a pour but de faire adhérer fortement le précipité d'euglobuline au fond du tube à centrifuger.

On surmonte ensuite ce précipité d'une solution saline isotonique à 8 gr. 5 par litre.

L'homoglobuline diffuse progressivement dans la solution saline tandis que la protéine visqueuse, non diffusible, reste au fond du tube sous forme d'une substance translucide et jaune de consistance très visqueuse.

On sépare l'homoglobuline par décantation, en prenant soin de ne recueillir que les deux tiers supérieurs de la solution, afin d'éviter l'entraînement d'une partie de la protéine visqueuse.

On dispose ensuite le culot translucide dans quelques centimètres cubes d'eau physiologique.

On obtient ainsi deux solutions, dont l'une l'homo-globuline est privée de tout caractère biologique, tandis que l'autre la protéine visqueuse, possède la totalité des caractères immunologiques de l'euglobuline.

On comprend maintenant les raisons qui ont motivé l'emploi de sérum chauffé, peu après leur sortie de l'organisme. Prenons, en effet, un sérum non chauffé, mais déjà vieilli et soumettons le au traitement précité.

En cours de dialyse, on observe déjà un abondant précipité d'euglobuline de Marcus Emil.

Toute tentative d'isolement de la protéine visqueuse dans ce précipité ne permettra d'obtenir qu'une protéine visqueuse mûrie, ne possédant plus l'aspect jaune, translucide, de la protéine visqueuse non évoluée, et ayant perdu son caractère de solubilité.

C'est cette protéine en voie de dénaturation que de nombreux auteurs ont observée.

Hardy, par exemple, signale qu'il existe dans l'euglobuline une protéine « grasseuse et visqueuse ».

Sandor lui-même obtient cette protéine au cours du fractionnement successif qu'il fait subir à l'euglobuline.

Doladilhe, enfin, avant d'isoler la protéine visqueuse signale l'existence d'une « protéine C », qui n'est autre que la protéine visqueuse, en voie d'évolution. Ceci s'explique aisément, par le fait que tous ces auteurs utilisent du sérum non chauffé, par conséquent non

stabilisé. De même ce mûrissement de la protéine visqueuse explique la difficulté que l'on rencontre en traitant l'euglobuline de Marcus Emil.

Durant les quatre à dix jours de dialyse la protéine visqueuse a suffisamment évolué pour être à demi dénaturée.

CHAPITRE III

ETUDE PHYSIO-BIOLOGIQUE DU CONSTITUANT VISQUEUX DES SERUMS HÉMOLYTIQUES

Nous avons utilisé pour ces expériences deux catégories de sérums hémolytiques provenant, les uns de chevaux préparés par les hématies de moutons, les autres de lapins préparés par des globules rouges humains.

Nous disposons donc de deux systèmes hémolytiques :

L'un anti-mouton ; l'autre anti-humain.

Nous nous sommes proposé de comparer la richesse en hémolysine de la protéine visqueuse de l'euglobuline, obtenue par la méthode de Mazille, au sérum complet lui-même.

SÉRUM ANTI-MOUTON.

Nous avons opéré, d'abord, sur un sérum hémolytique anti-mouton.

On soumet à la dialyse 10 cc³ de l'immunsérum.

Après l'opération on fait deux parties égales du dialysat et l'on précipite l'euglobuline de chacune d'elle.

On disperse alors l'un des précipités dans 5 cc³ d'eau physiologique pour en extraire l'homoglobuline.

On disperse enfin le culot résiduel de protéine visqueuse dans 5 cc³ d'eau physiologique.

On obtient ainsi trois solutions, qui, sous le volume de 5 cc³, contiennent respectivement l'euglobuline totale, tirée de 5 cc³ de sérum complet, et ses deux constituants.

Nous avons, alors, tenté de comparer les pouvoirs anticorps de ces différentes solutions, à celle du sérum complet, en opérant de la façon suivante :

A un volume v (1 cc³) d'une suspension à 5 % de globules rouges de mouton, on ajoute :

a) Soit les volumes croissants des solutions précitées et du sérum complet, ainsi qu'une même quantité d'alexine. On détermine alors le temps nécessaire pour produire l'hémolyse totale.

b) Soit le même volume de solution ou de sérum complet, mais, des volumes croissants d'alexine.

La mesure s'effectue dans les mêmes conditions, en notant le temps nécessaire pour provoquer l'hémolyse totale.

Dans tous les cas, les divers mélanges sont complétés au même volume par l'addition d'eau physiologique.

Nous donnons ci-dessous, le résultat de l'une de nos expériences, en choisissant par exemple le cas où les volumes de solutions ou de sérums étant identiques, on varie les quantités d'alexine.

Nous utilisons comme alexine, du sérum de cobaye frais dilué trente fois dans l'eau physiologique.

Les chiffres inscrits dans le tableau I représentent le temps au bout duquel l'hémolyse des mélanges est totale (V indiquant les volumes croissants d'alexine ajoutée). Les volumes des solutions, ou du sérum complet, utilisés dans cette expérience étant de 0 cc³ l, et les différents mélanges étant ramenés au volume de 3 cc³.

TABLEAU I

V	0,1	0,2	0,5	0,7	0,8	1
Sérum	50 m.	30 m.	10 m.	5 m.	5 m.	5 m.
Euglobuline	5 h.	3 h.	1 h.	50 m.	45 m.	30 m.
Protéine visqueuse .	5 h.	3 h.	1 h.	45 m.	35 m.	25 m.
Homoglobuline . . .	Pas d'Hémolyse					

SÉRUM ANTI-HUMAIN.

Nous avons utilisé pour ces expériences des suspensions de globules rouges à 2 %.

Les résultats sont en tous points comparables à ceux obtenus en utilisant le sérum anti-mouton.

Quarante à cinquante minutes sont nécessaires pour obtenir l'hémolyse totale avec l'euglobuline de la protéine visqueuse, alors que quelques minutes suffisent avec un sérum complet.

Ces recherches ont toutefois le mérite de montrer que l'euglobuline obtenue par la méthode de Mazille sans contenir la totalité de l'hémolysine en renferme cependant une quantité appréciable.

Nous avons dit plus haut que la protéine visqueuse subit, dès la sortie de l'organisme un mûrissement

granulaire qui la conduit peu à peu à la dénaturation. Il ne semble pas toutefois que ce mûrissement atteigne la totalité de la protéine.

Plus précisément les granules constitutives de ce colloïde complexe n'évoluent pas toutes avec la même vitesse vers cette dénaturation.

Cette hypothèse nous est suggérée par certaines expériences que nous avons effectuées.

Isolons l'euglobuline d'un sérum, dès sa sortie de l'organisme, et dans ce but soumettons ce sérum à la dialyse, immédiatement après la prise de sang, *sans chauffage préalable*, en renouvelant l'eau de dialyse toutes les heures.

On peut extraire dans ces conditions une protéine visqueuse moyennant évoluée.

Conservons stérilement et à 0° la solution physiologique de cette protéine visqueuse. Nous constaterons, alors, une rapide évolution de l'état physique du colloïde : la solution s'opacifie progressivement, à mesure que se prolonge le vieillissement, et, quinze à vingt jours suffisent pour obtenir une sédimentation d'une partie de la protéine qui est devenue totalement insoluble en milieu salin.

Après un mois, la centrifugation de la solution permet d'obtenir un abondant précipité.

Le surnageant, qui est parfaitement limpide, est encore riche en protéines. En effet l'addition d'acétone y provoque un abondant précipité. Il en reste donc une fraction colloïdale stable, non atteinte par le mûrissement.

Nous avons cherché à préciser ce fait par une expé-

rience établie en collaboration, avec MM. Doladilhe et Mazille.

Nous avons utilisé du sérum hémolytique frais, provenant d'un cheval immunisé.

Après quarante jours de vieillissement, nous avons recherché la richesse en hémolysine de la fraction colloïdale non évoluée de la protéine visqueuse.

1/10 cc³ de cette solution sensibilisait, en effet, 0,5 de globules rouges de mouton à l'action lysante de 0,5 d'une alexine de cobaye diluée 10 fois.

On obtenait l'hémolyse totale en vingt-cinq minutes.

Un égal volume d'une solution semblable, tirée à ce moment du même sérum hémolytique (qui avait été préalablement stabilisé par chauffage) et additionné de la même quantité d'alexine, provoquait en vingt minutes l'hémolyse totale de 0 cc³ 5 de la suspension globulaire.

En procédant à de nombreuses réactions d'hémolyse, nous avons constaté, en somme, que le mûrissement granulaire de colloïde visqueuse n'affecte pas sensiblement l'hémolysine.

Ce résultat permet de penser que les substances anticorps (ou la protéine douée de la propriété anticorps) se différencient des autres protéines par une résistance plus grande aux atteintes du phénomène colloïdal de mûrissement.

On peut, en somme, émettre l'hypothèse très séduisante d'une différenciation possible entre les protéines anticorps et les protéines normales.

L'expérience confirme cette hypothèse.

Séparation de la protéine visqueuse en fraction de propriétés physiques différentes

La protéine visqueuse est un complexe lipoprotéique. On y trouve, en effet, des lipides solubles dans l'acétone et des substances qui donnent les réactions des protéines (Esbach, Buiret, etc.).

Ces lipides peuvent être extrait en partie par l'acétone. Morel a montré dernièrement que ces lipides acéto-solubles contenue dans la protéine visqueuse sont dénués, non seulement de propriétés anticorps, mais aussi de tous caractères anaphylactiques.

Substance à grosses molécules, la protéine visqueuse en possède le caractère essentiel : elle est indialysable.

Si l'on soumet à la dialyse une solution de protéine visqueuse, en milieu salin isotonique, on constate les faits suivants :

- a) On ne trouve aucune trace dans l'eau de dialyse.
- b) Le dialysat de protéine visqueuse se trouble, la protéine visqueuse précipite.

Cette propriété de la protéine visqueuse n'est cependant pas aussi absolue que les remarques précédentes le laisseraient entendre.

Il suffit, en effet, de dissoudre la protéine visqueuse en milieu salin alcalin, ou même dans une solution de soude ou d'ammoniaque, pour constater dans l'eau de dialyse la présence d'une légère quantité de protéine visqueuse, contrôlable par le phénomène d'anaphylaxie.

L'eau de dialyse acquiert, en effet, dans ce cas, la propriété de déclancher le choc anaphylactique chez le cobaye sensibilisé.

Précisons que ce pouvoir anaphylactisant est l'apanage de la protéine visqueuse ainsi que l'ont démontré les travaux de MM. Charpentier, Doladilhe, Morel, Placidi et Mazille.

En résumé, la protéine visqueuse doit être considérée comme un complexe colloïdal dont les dimensions granulaires diminuent beaucoup en milieu alcalin.

SOLUBILITÉ DANS L'EAU DE LA PROTÉINE VISQUEUSE

On a l'habitude en sérologie de caractériser les protéines par leur degré de solubilité dans l'eau.

Ainsi l'euglobuline se différencie de la pseudo-globuline par son insolubilité dans l'eau.

Cette constante physique ne présente pas toujours une signification aussi rigoureuse qu'on pourrait le penser. Dire qu'une substance est insoluble dans l'eau distillée, par exemple, suppose que ce milieu est parfaitement défini. On oublie trop souvent que l'eau distillée des laboratoires ne correspond jamais à la solution simple et idéale, définie par la formule H^2O , et qui, par le mécanisme de la dissociation électrolytique donne : $H^2O = H + OH$. L'eau distillée n'est jamais neutre avec $pH=7$.

Elle est le plus souvent *acide*, par suite de la dissolution d'une légère quantité de CO^2 dans l'eau, et le pH oscille en réalité entre 5,5 et 6,5.

Dire qu'une substance est insoluble dans l'eau dis-

tillée revient à dire qu'elle est insoluble dans un milieu légèrement acide.

Le pH exerce certainement une influence sur la solubilité de la protéine visqueuse.

Prenons plusieurs culots de Protéine Visqueuse provenant chacun de 10 cc³ d'un sérum de cheval, et dispersons-les dans 10 cc³ d'eau distillée ordinaire à des pH différents par l'addition de quantités très faibles d'ammoniaque.

On constate que la solubilité de la protéine visqueuse, presque nulle dans l'eau distillée ordinaire (pH = 5,9), croit dans le même sens que le pH, c'est-à-dire avec le degré d'alcalinité progressive de la solution.

Dans une deuxième série d'expérience augmentons progressivement l'acidité de la solution, par l'addition croissante d'une solution d'H Cl ; on constate que la solubilité augmente avec l'acidité.

Inversement les solutions acides ou alcalines, ainsi obtenues, précipitent lorsqu'on diminue leur acidité ou leur alcalinité.

Ces expériences, très simples, démontrent que la solubilité de la protéine visqueuse dépend essentiellement du pH. Il est d'ailleurs inexact de dire que la protéine visqueuse est totalement insoluble dans l'eau, il serait plus juste de dire qu'elle est peu soluble.

Dispersons, en effet, dans l'eau distillée (de pH variant entre 5,7 et 6,5) un précipité de protéine visqueuse et, centrifugeons-le, pour séparer la fraction insoluble. La solution surnageante présente les réactions de protéines et sensibilise anaphylactiquement le cobaye à la protéine visqueuse.

THERMOSTABILITÉ DE LA PROTÉINE VISQUEUSE

La fraction de la protéine visqueuse, *insoluble en eau distillée*, est un complexe colloïdal dont une partie est particulièrement thermolabile :

Si l'on chauffe entre 50° et 60° cette fraction en présence d'eau distillée, pendant une heure environ, on constate que la protéine, qui avant le chauffage était entièrement soluble en milieu isotonique de Na Cl, est devenue, en grande partie insoluble dans ce milieu salin.

La dénaturation produit par la chaleur est complète ; l'insolubilité de la fraction protéique thermolabile existe non seulement vis-à-vis de la solution isotonique de Na Cl, mais aussi, vis-à-vis des solutions légèrement alcalines.

On peut donc très facilement séparer la Protéine Visqueuse en deux fractions, l'une *thermostabile*, l'autre *thermolabile*, par la technique suivante :

1° Isolement de la protéine visqueuse, sous forme d'un culot translucide, suivant la méthode exposée précédemment ;

2° Dispersion par agitation du complexe visqueux dans l'eau distillée ordinaire (on utilise un volume d'eau distillée égal à celui du sérum dont provient la protéine visqueuse) ;

3° Chauffage à 55° pendant une heure de cette suspension qui est ensuite isotonisée par addition au 1/10

de son volume d'une solution de Na Cl hypertonique (85 ‰).

Mais, que devient l'anticorps au cours de cette séparation ? Les expériences exposées dans le chapitre suivant répondront à cette question.

CHAPITRE IV

PROPRIETES ANTICORPS DE LA FRACTION THERMOSTABILE DE LA PROTEINE VISQUEUSE

Nous avons préparé la solution de la fraction thermostable de la protéine visqueuse, suivant la technique exposée dans le chapitre précédent.

Nous avons effectué ces expériences sur le sérum hémolytique provenant du cheval (anti-mouton) et du lapin (anti-humain).

Nous avons comparé les richesses en hémolysine de ces solutions purifiées et des solutions équivalentes en protéine visqueuse.

In vitro, les pouvoirs sensibilisants de ces solutions sont très sensiblement égaux, ainsi que le démontre l'expérience suivante :

— On sépare la protéine visqueuse de deux précipités d'euglobuline, provenant chacun de 10 cc³ de sérum hémolytique anti-mouton.

— On dissout le premier culot de protéine visqueuse dans 11 cc³ d'eau physiologique. La solution obtenue constituera la solution non purifiée de protéine visqueuse.

— On disperse le deuxième culot dans 10 cc³ d'eau distillée et on le traite comme il est dit précédemment pour en isoler la fraction thermostable.

Après isotonisation on obtient donc 11 cc³ d'une solution de cette fraction thermostable.

Pour comparer la teneur en hémolysine de ces deux solutions on détermine le temps au bout duquel une même dose d'alexine provoque l'hémolyse d'un mélange, formé d'une même quantité de globules rouges de mouton, et de quantités croissantes de l'une et l'autre de ces solutions.

Dans cette série d'expériences les mélanges sont constitués par 1 cc³ d'une solution isotonique à 5 % de globules rouges de mouton et par des volumes V croissants de l'une et l'autre des solutions. On complète à 3 cc³ par addition d'eau physiologique.

A chacun des tubes on ajoute 0 cc³ 2 d'une solution isotonique au 1/10 d'une même alexine (sérum de cobaye).

Les chiffres inscrits dans le tableau suivant expriment les temps nécessaires pour provoquer l'hémolyse totale, à une température de 37°.

TABLEAU II

V	cc ³ 0,1	cc ³ 0,3	cc ³ 0,5	cc ³ 0,7	cc ³ 0,9	cc ³ 1
Solution de protéine visqueuse, non pu- rifiée	3 h. 05	1 h. 50	70'	50'	35'	20'
Solution de protéine visqueuse purifiée..	3 h. 15	2 h.	75'	48'	35'	20'

Ces résultats montrent que la solution purifiée de protéine visqueuse est très sensiblement aussi riche en hémolysine que la solution équivalente, non purifiée.

En outre, ce procédé de purification n'altère pas sa propriété de transmettre l'hémolysine par immunité passive.

Nous l'avons vérifié en procédant, sur deux lots de cobayes, à des injections également répétées de solution de protéine visqueuse purifiée et non purifiée.

Tous les deux jours, on inocule à chaque animal et, par voie intracardiaque, 1 cc³ de l'une ou l'autre des solutions.

On limite à 4 le nombre de ces injections.

Deux jours après la dernière injection on prélève à chaque animal, par ponction cardiaque 2 cc³ de sang, afin de déterminer le pouvoir hémolytique du sérum, vis-à-vis des globules rouges de mouton.

On constate que ces sérums renferment tous une certaine quantité d'hémolysine, qui n'a pu leur être transmise que par immunité passive.

(Afin d'éviter toute cause d'erreur, nous avons vérifié que le sang de ces cobayes n'était pas spontanément hémolysé par les globules rouges de mouton.)

Le tableau suivant illustre ces résultats.

Les chiffres indiquent les temps au bout duquel des volumes croissants de sérum de chacun de ces cobayes provoquent l'hémolyse de 0 cc³ 2 d'une suspension à 5 % de globules rouges de mouton, dans un mélange complété à 3 cc³ par de l'eau physiologique.

TABLEAU III

cc ³	Cobaye n° I	Cobaye n° II	Cobaye n° III
0,1	1 h. 20	60 min.	1 h. 30
0,3	55 min.	43 min.	1 h.
0,5	30 min.	20 min.	45 min.
0,7	15 min.	10 min.	30 min.
1.	10 min.	5 min.	25 min.

Aux cobayes II et III, nous avons injecté des solutions purifiées, tandis que le cobaye n° I a reçu des injections de protéine visqueuse non purifiée.

Les temps d'hémolyse sont à peu près identiques.

Ainsi, au cours du fractionnement, l'hémolysine se concentre dans la fraction thermostable, celle-ci ne représentant pondéralement qu'une faible partie de la protéine visqueuse. Pour le déterminer, nous avons pesé respectivement, après dessiccation à 80° la fraction thermolabile d'une part et la fraction thermostable d'autre part.

En opérant sur 100 cc³ de sérum, nous avons obtenu :

- fraction thermostable 0 gr. 67
- fraction thermolabile 2 gr. 45

La solution purifiée de protéine visqueuse contient donc très peu de substances dissoutes.

L'analyse anaphylactique permet d'ailleurs de mettre en évidence cette faible teneur en protéines.

Nous avons « préparé » plusieurs cobayes par des injections sous-cutanées à 0 cc³ 1 de sérum de cheval.

Trois semaines après, nous constatons sur l'un d'eux

la sensibilisation anaphylactique vis-à-vis de sérum de cheval en l'éprouvant par l'injection intracardiaque de 0 cc³ 5. Il meurt en quelques minutes, d'un choc anaphylactique type.

Eprouvons un deuxième cobaye avec 1 cc³ d'une solution de protéine visqueuse non purifiée.

L'animal présente un choc anaphylactique.

Par contre l'injection intracardiaque de 1 cc³ de solution purifiée de protéine visqueuse ne détermine, chez les autres cobayes, aucun symptôme de choc anaphylactique.

Il ne faudrait pas, cependant, conclure de ces expériences que la solution purifiée ne contient plus de protéine ou plus exactement ne présente plus, biologiquement, le caractère de protéines sériques du cheval.

Il suffit, en effet, d'augmenter de façon appréciable la dose injectée pour voir apparaître un choc typique. Nous avons ainsi obtenu un choc anaphylactique en injectant sous un volume de 1 cc³ l'extrait sec, fourni dans le vide par 10 cc³ de solution purifiée de protéine visqueuse.

CONCLUSIONS

I. — La propriété anticorps d'un immunsérum est l'apanage de sa globuline. Elle est inégalement répartie entre ses deux constituants.

La pseudoglobuline et l'euglobuline, que la méthode de Mazille permet de définir : « La protéine qui, dans un sérum dialysé, précipite par les ions H.

II. — L'anticorps contenu dans l'euglobuline, ainsi définie n'est lié qu'à une faible partie de cette protéine.

Doladilhe a montré que la simple dispersion d'un culot d'euglobuline, dans une solution saline isotonique, permet de distinguer deux constituants physiquement et biologiquement différents :

L'Hémoglobuline et la Protéine Visqueuse.

III. — Les propriétés immunologiques sont localisées dans la Protéine Visqueuse, complexe colloïdal dont les granules se différencient par leurs propriétés physiques, en deux fractions réagissant différemment à la chaleur.

Une suspension de Protéine Visqueuse, portée à 55° pendant une heure dans de l'eau distillée, puis isotonisée, précipite la fraction thermolabile, isolant aussi une fraction thermostable.

IV. — En effectuant ces expériences sur l'euglobuline de sérum hémolytique nous avons constaté que la presque totalité de l'hémolysine se retrouve dans la fraction thermostable.

V. — Les solutions purifiées de Protéine Visqueuse sont, en définitives très pauvres en protéines.

Toutes conditions égales, elles sont beaucoup moins anaphylactisantes que les solutions correspondantes d'euglobuline.

Vu :

LE DOYEN :
JEAN LEPINE.

Vu :

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE :
F. ARLIOING.

Vu et permis d'imprimer :

Lyon, le 19 Juin 1939

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
A. LIRONDELLE.

BIBLIOGRAPHIE

- ADLER et GAY. — *Journ. of Medic. research.* t. XIII, p. 443, 1908.
- ARTHUS. — De l'anaphylaxie à l'immunité. Masson, édit. 1921.
- ARLOING et LANGERON. — Les chocs en pathologie et en expérimentation. *Journal de Médecine de Lyon*, p. 285, juillet 1923.
- BESREDKA. — *Annales de l'Institut Pasteur*, p. 54, 1920.
- CHARPENTIER, DOLADILHE et MOREL. — C. R. *Acad. des Sciences*, t. 204, p. 451, 1937.
- CHARPENTIER, DOLADILHE, MOREL et PLACIDI. — C. R. *Soc Biol.*, t. CXXVI, p. 557, 1937.
- DOLADILHE. — *Ann. Inst. Pasteur*, t. 57, p. 443, 1936.
— *Ann. Inst. Pasteur*, t. 59, p. 624, 1937.
— C. R. *Acad. des Sciences*, t. 204, p. 382, 1937.
— C. R. *Acad. des Sciences*, t. 206, p. 787, 1937.
- DOLADILHE et MOREL (Charles). — C. R. *Soc. Biol.*, t. CXXII, p. 1310, 1936.
- FULD et SPIRO. — *Zeitscher f. phys. chem.*, 1900, t. 31, p. 132.
- GUILLERMET (M^{lle}). — Sérum sanguin chez l'homme. Etude physico-chimique. *Thèse, Lyon*, 1924.
- HOFMEISTER. — *Arch. f. exp. path. u. pharm.*, 1888-1890, t. 24-25-26-27-28.
- MARCUS (Emil.). — *Zeitscher f. physiolog. chemie*, 1899, t. 28, p. 559.

MOREL. — *Thèse* Dijon, 1937.

— C. R. Soc. Biol., t. CXXIV, p. 3, 1937.

MAZILLE. — Analyse anaphylactique de l'euglobuline

Thèse, Fac. des Sciences, Dijon, janvier 1938.

NICOLLE. — Les antigènes et les anticorps. Masson, édit.,
1920.

PORGES et SPIRO. — *Beitz. z. chem. phys. u path.*, t. III,
p. 277.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	9
CHAPITRE PREMIER. — L'euglobuline	15
Préparation	17
CHAPITRE II. — Les constituants de l'euglobuline....	21
Méthode de séparation	23
CHAPITRE III. — Etude physio-biologique du constituant visqueux des sérums hémolytiques	27
Séparation de la protéine visqueuse en fraction de propriétés physiques différentes	32
Solubilité dans l'eau	33
Thermostabilité	35
CHAPITRE IV. — Propriétés anticorps de la fraction thermostable de la protéine visqueuse	37
CONCLUSIONS	43
BIBLIOGRAPHIE	45



BOSC FRÈRES, M. & L. RIOU

°° °° °° IMPRIMEURS-ÉDITEURS °° °° °°

°° 42, QUAI GAILLETON, 42 °°

°° °° °° °° LYON °° °° °° °°



